

AMPK 激活通过抑制铁死亡缓解脂多糖诱导的脓毒症相关急性肾损伤

王勉 康印东 张斌 张春雷 李佛荣 蒋星明 李家豪 常德辉

中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院泌尿外科,甘肃省干细胞与基因药物重点实验室
兰州 730050

通信作者:常德辉, Email: chdhui@163.com

【摘要】 目的 探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活对脂多糖(LPS)诱导脓毒症相关急性肾损伤(SA-AKI)中铁死亡的调控作用及分子机制。**方法** 将30只SPF级C57BL/6雄性小鼠按随机数字表法分为对照组、LPS组和LPS+AMPK激活剂(AICAR)组,每组10只。LPS+AICAR组于制模前腹腔注射AICAR 500 mg/kg 干预30 min;对照组和LPS组腹腔注射等量生理盐水。采用腹腔内注射LPS 10 mg/kg的方法建立SA-AKI模型;对照组腹腔内注射等量生理盐水。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清炎症因子[白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)]水平;通过生化检测血清肾功能指标[血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)]及肾组织铁死亡关键因子[Fe²⁺、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)]水平;苏木素-伊红(HE)染色后,光镜下观察肾组织病理学改变;透射电镜下观察肾组织线粒体超微结构改变;采用定量实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肾组织AMPK、铁死亡关键酶[乙酰辅酶A合成酶长链家族4(ACSL4)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)]及核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶1(HO-1)通路的mRNA和蛋白表达。**结果** 与对照组比较,LPS组小鼠肾小管结构失常,上皮细胞出现空泡变性和坏死,间隙肿胀,部分上皮细胞脱落,炎症细胞浸润;肾组织线粒体表现出典型铁死亡特征;血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SCr和BUN水平均升高,肾组织Fe²⁺、MDA水平及ACSL4的mRNA和蛋白表达均升高,肾组织GSH水平、AMPK的蛋白表达及SLC7A11、GPX4、Nrf2、HO-1的mRNA和蛋白表达均降低(均 $P < 0.05$)。与LPS组比较,LPS+AICAR组小鼠肾小管结构及空泡变性明显缓解,间隙肿胀及炎症浸润程度均明显减轻;肾组织线粒体铁死亡特征改变明显减轻;血清IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SCr和BUN水平均降低[IL-1 β (ng/L):68.93 \pm 9.37比91.25 \pm 10.55,IL-6 (ng/L):80.03 \pm 7.86比93.10 \pm 6.16,TNF- α (ng/L):484.77 \pm 51.00比558.59 \pm 48.54,SCr (μ mol/L):31.75 \pm 5.08比57.63 \pm 6.37,BUN (mmol/L):23.93 \pm 4.44比36.35 \pm 5.47,均 $P < 0.05$],肾组织Fe²⁺、MDA水平[Fe²⁺ (μ mol/g):4.02 \pm 0.74比6.84 \pm 1.41,MDA (μ mol/g):1.44 \pm 0.62比2.62 \pm 0.62,均 $P < 0.05$]及ACSL4的mRNA和蛋白表达均降低(ACSL4 mRNA:1.98 \pm 0.50比3.67 \pm 0.80,ACSL4/GAPDH:0.49 \pm 0.08比0.94 \pm 0.12,均 $P < 0.05$),肾组织GSH水平(μ mol/kg):4.35 \pm 0.50比3.49 \pm 0.94)及AMPK、SLC7A11、GPX4、Nrf2、HO-1的mRNA和蛋白表达均升高[mRNA表达:AMPK mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}):2.68 \pm 0.27比1.22 \pm 0.24,SLC7A11 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}):0.04 \pm 0.01比0.01 \pm 0.00,GPX4 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}):5.15 \pm 1.21比3.40 \pm 0.45,Nrf2 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}):0.57 \pm 0.29比0.22 \pm 0.23,HO-1 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}):0.12 \pm 0.03比0.02 \pm 0.01;蛋白表达:p-AMPK/AMPK比值:1.19 \pm 0.14比0.50 \pm 0.15,SLC7A11/GAPDH:0.55 \pm 0.07比0.34 \pm 0.10,GPX4/GAPDH:0.56 \pm 0.11比0.18 \pm 0.08,Nrf2/GAPDH:0.89 \pm 0.20比0.36 \pm 0.08,HO-1/GAPDH:0.75 \pm 0.07比0.54 \pm 0.06;均 $P < 0.05$]。**结论** AMPK可能通过Nrf2/HO-1信号通路抑制铁死亡,从而发挥对LPS诱导SA-AKI小鼠的保护作用。

【关键词】 腺苷酸活化蛋白激酶;脓毒症;急性肾损伤;铁死亡;脂多糖

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250303-00123

AMP-activated protein kinase activation alleviates lipopolysaccharide-induced sepsis-associated acute kidney injury by inhibiting ferroptosis

Wang Mian, Kang Yindong, Zhang Bin, Zhang Chunlei, Li Forong, Jiang Xingming, Li Jiahao, Chang Dehui

Department of Urology, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Chang Dehui, Email: chdhui@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory role of AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in ferroptosis during lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis-associated acute kidney injury (SA-AKI) and its molecular mechanisms. **Methods** Thirty SPF male C57BL/6 mice were randomly assigned to the control group, LPS group, and LPS+AMPK activator (AICAR) group using a random number table method, with 10 mice per group. Mice in the LPS+AICAR group received an intraperitoneal injection of AICAR at a dose of 500 mg/kg for intervention 30 minutes prior to model establishment, while those in the control group and LPS group were intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. The SA-AKI model was induced via intraperitoneal injection of LPS at 10 mg/kg, and

the control group was intraperitoneally administered an equal volume of normal saline. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the serum concentrations of inflammatory factors [including interleukins (IL-1 β , IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α)]. Serum renal function indicators [including serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN)], as well as the levels of key ferroptosis-related factors [including Fe²⁺, malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH)] in renal tissues were measured using biochemical assays. Hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted to observe histopathological changes in renal tissues under a light microscope, and transmission electron microscopy was used to examine the ultrastructural alterations of mitochondria in renal tissues. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting were employed to determine the mRNA and protein expression levels of AMPK, key ferroptosis-related enzymes [long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4)], as well as the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway-related molecules in renal tissues. **Results** Compared with the control group, mice in the LPS group exhibited renal tubular structural disorder, with vacuolar degeneration, necrosis, and shedding of epithelial cells, interstitial edema, and inflammatory cell infiltration. Mitochondria in renal tissues showed typical ferroptosis characteristics. Moreover, the levels of serum IL-1 β , IL-6, TNF- α , SCr, and BUN were significantly elevated. In renal tissues, the levels of Fe²⁺ and MDA, along with the mRNA and protein expression of ACSL4, were increased, whereas the GSH level, protein expression of AMPK, and mRNA and protein expression of SLC7A11, GPX4, Nrf2, and HO-1 were markedly decreased (all $P < 0.05$). In contrast to the LPS group, mice in the LPS+AICAR group displayed significant alleviation of renal tubular structural damage and vacuolar degeneration, as well as reduced interstitial edema and inflammatory infiltration. The ferroptosis-related ultrastructural changes in renal mitochondria were also notably ameliorated. The serum concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α , SCr, and BUN were significantly lower in the LPS+AICAR group than in the LPS group [IL-1 β (ng/L): 68.93 \pm 9.37 vs. 91.25 \pm 10.55, IL-6 (ng/L): 80.03 \pm 7.86 vs. 93.10 \pm 6.16, TNF- α (ng/L): 484.77 \pm 51.00 vs. 558.59 \pm 48.54, SCr (μ mol/L): 31.75 \pm 5.08 vs. 57.63 \pm 6.37, BUN (mmol/L): 23.93 \pm 4.44 vs. 36.35 \pm 5.47, all $P < 0.05$]. Additionally, the levels of Fe²⁺ and MDA in renal tissues were significantly reduced in the LPS+AICAR group compared with the LPS group [Fe²⁺ (μ mol/g): 4.02 \pm 0.74 vs. 6.84 \pm 1.41, MDA (μ mol/g): 1.44 \pm 0.62 vs. 2.62 \pm 0.62, both $P < 0.05$], accompanied by downregulated mRNA and protein expression of ACSL4 (ACSL4 mRNA: 1.98 \pm 0.50 vs. 3.67 \pm 0.80, ACSL4/GAPDH: 0.49 \pm 0.08 vs. 0.94 \pm 0.12, both $P < 0.05$). Furthermore, the renal GSH level was higher in the LPS+AICAR group than in the LPS group (μ mol/kg: 4.35 \pm 0.50 vs. 3.49 \pm 0.94), along with significantly upregulated mRNA and protein expression of AMPK, SLC7A11, GPX4, Nrf2, and HO-1 [mRNA expression: AMPK mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}): 2.68 \pm 0.27 vs. 1.22 \pm 0.24, SLC7A11 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}): 0.04 \pm 0.01 vs. 0.01 \pm 0.00, GPX4 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}): 5.15 \pm 1.21 vs. 3.40 \pm 0.45, Nrf2 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}): 0.57 \pm 0.29 vs. 0.22 \pm 0.23, HO-1 mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ Ct}): 0.12 \pm 0.03 vs. 0.02 \pm 0.01; protein expression: p-AMPK/AMPK ratio: 1.19 \pm 0.14 vs. 0.50 \pm 0.15, SLC7A11/GAPDH: 0.55 \pm 0.07 vs. 0.34 \pm 0.10, GPX4/GAPDH: 0.56 \pm 0.11 vs. 0.18 \pm 0.08, Nrf2/GAPDH: 0.89 \pm 0.20 vs. 0.36 \pm 0.08, HO-1/GAPDH: 0.75 \pm 0.07 vs. 0.54 \pm 0.06, all $P < 0.05$]. **Conclusion** AMPK may exert protective effects against LPS-induced SA-AKI in mice by inhibiting ferroptosis through the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

【Key words】 AMP-activated protein kinase; Sepsis; Acute kidney injury; Ferroptosis; Lipopolysaccharide

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250303-00123

脓毒症是机体对感染诱发的免疫反应失调引起的多器官功能障碍综合征^[1],肾脏作为脓毒症先行受累的器官之一,约一半以上的脓毒症患者发生急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),病死率甚至超过 41%,与单纯的 AKI 或感染相比预后更差,伴有 AKI 被认为是预测脓毒症患者死亡的独立危险因素之一^[2]。脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated acute kidney injury, SA-AKI)的机制尚未完全阐明,涉及炎症反应、代谢重编程、微循环功能障碍和多类型细胞死亡(如铁死亡),由于缺乏特异性治疗手段且现有方法的临床效果有限,患者病死率仍居高不下^[3]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为“能量代谢总开关”,通过促进脂质氧化及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)生成维持细胞能量平衡,通过调控铁死亡可改善脑缺血再灌注损伤^[4]。AMPK 是

否通过改变能量代谢、调控铁死亡进而在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 SA-AKI 中发挥作用及其机制尚不清楚。基于此,本研究开展动物实验,旨在为 AMPK 改善 SA-AKI 的临床治疗提供新方向及理论依据。

1 材料与与方法

1.1 实验动物: 采用雄性 SPF 级健康 C57BL/6 小鼠 30 只,6~8 周龄,体质量(20 \pm 3)g,由北京华康康生物技术有限公司提供〔动物许可证号:SCXK(京)2019-0008〕。采用标准饲养环境〔20~25℃,(50 \pm 5)%相对湿度,12 h 昼夜循环灯〕,小鼠可自由活动及饮水进食。本研究符合动物伦理学标准,并经中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院科研管理伦理委员会审查(审批号:2024KYLL050)。

1.2 主要试剂: AMPK 激活剂 AICAR 购自美国 MCE 公司;LPS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;血

肌酐 (serum creatinine, SCr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 检测试剂盒购自南京建成公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒、总铁离子、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒购自武汉塞维尔科技公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukins, IL-1 β 、IL-6) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自北京志超伟业公司; 抗体及引物谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、乙酰辅酶 A 合成酶长链家族 4 (long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4)、AMPK、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK)、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 购自武汉塞维尔科技公司。

1.3 实验分组及处理: 小鼠适应饲养环境 1 周后, 将小鼠按随机数字表法分为对照组、LPS 组和 LPS+AICAR 组, 每组各 10 只。LPS+AICAR 组于制模前腹腔注射 AICAR 500 mg/kg 干预 30 min; 对照组和 LPS 组腹腔注射等量生理盐水。随后, LPS 组和 LPS+AICAR 组小鼠腹腔内注射 LPS 10 mg/kg, 饲养 24 h 后建立 SA-AKI 模型^[5-7]; 对照组腹腔内注射等量生理盐水。

1.4 肾组织病理切片的制备和观察: 处死小鼠取肾组织, 行 4% 多聚甲醛固定, 石蜡浸泡包埋处理。制备 4 μ m 厚的石蜡切片、脱蜡、水化和苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 在光镜下观察肾组织形态变化。

1.5 ELISA 法测定血清炎症因子: 采用眼球摘取法取小鼠血清, ELISA 法测定小鼠血清促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 所有步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 生化检测肾功能及铁死亡关键因子的表达水平: 取小鼠血清及肾组织标本, 严格按照试剂盒说明书测定小鼠血清 SCr、BUN 水平及肾组织 Fe²⁺、MDA 和 GSH 表达水平。

1.7 肾组织线粒体形态观察: 取小鼠肾皮质组织, 修整为 2 mm \times 2 mm \times 2 mm, 于电镜固定液内 25 $^{\circ}$ C 避光固定 2 h, 脱水后包埋, 最后切片、双染色, 于透射电镜下观察线粒体超微结构变化。

1.8 定量实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction,

RT-qPCR) 检测肾组织铁死亡关键酶及 Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达水平: 使用 RNA 快速提取试剂盒从肾脏中提取总 RNA, 用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度。使用 RT First Strand cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 通过扩增反应检测 AMPK、ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 及 Nrf-2、HO-1 的 mRNA 水平, 并使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行定量分析。

1.9 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肾组织铁死亡关键酶及 Nrf2、HO-1 的蛋白表达水平: 取各组小鼠的肾组织样品, 加入 RIPA 裂解液研磨为组织匀浆。用 BCA 法定量蛋白浓度, 经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜、封闭后放置于抗体中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 [AMPK、p-AMPK、ACSL4、SLC7A11、GPX4、Nrf2、HO-1 抗体稀释比例均为 1:1 000, 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 稀释比例 1:3 000]。使用含吐温 20 的 Tris 缓冲液 (Tris-buffered saline with Tween 20, TBST) 洗膜, 加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)-山羊抗兔二抗 (1:3 000), 室温孵育 2 h, 最后用显影液对条带进行可视化显影, 通过 Image J 软件分析各组蛋白电泳条带的灰度值, 以 GAPDH 作为内参, 以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学分析: 采用 SPSS 27.0.1 软件进行数据分析, GraphPad Prism 9.5 软件进行绘图。计量资料呈正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 方差齐时组间比较采用 LSD 检验, 方差不齐时组间比较采用 Dunnett's T3 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织 AMPK 的表达比较 (表 1; 图 1): 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织 AMPK mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$), p-AMPK/AMPK 表达降低 ($P < 0.05$)。激活 AMPK 后, 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠肾组织 AMPK mRNA 表达和 p-AMPK/AMPK 表达升高 (均 $P < 0.05$)。

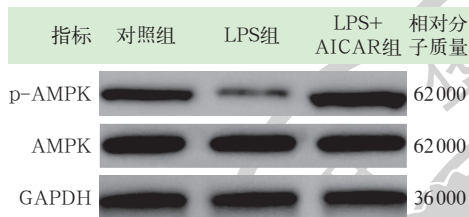
2.2 各组小鼠肾组织病理学改变 (图 2): 光镜下显示, 与对照组比较, LPS 组小鼠肾小管结构失常, 上皮细胞出现空泡变性和坏死, 间隙肿胀, 部分上皮细胞脱落, 炎症细胞浸润; 与 LPS 组比较,

LPS+AICAR 组小鼠肾小管结构及空泡变性明显缓解,间隙肿胀及炎症浸润程度均明显减轻,提示激活 AMPK 可减轻小鼠肾组织病理损伤。

表 1 各组小鼠肾组织 AMPK 的 mRNA 和蛋白表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	AMPK mRNA	p-AMPK/AMPK 比值
对照组	10	1.49 ± 0.50	0.85 ± 0.06
LPS 组	10	1.22 ± 0.24	0.50 ± 0.15 ^a
LPS+AICAR 组	10	2.68 ± 0.27 ^b	1.19 ± 0.14 ^b

注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂, p-AMPK 为磷酸化 AMPK; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$



注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂, p-AMPK 为磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶, GAPDH 为 3-甘油醛磷酸脱氢酶

图 1 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肾组织 AMPK 的蛋白表达

2.3 各组小鼠血清炎症因子比较 (表 2): 与对照组比较, LPS 组小鼠血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均升高 (均 $P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠血清促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均降低 (均 $P < 0.05$)。提示激活 AMPK 可降低小鼠炎症因子水平。

表 2 各组小鼠血清炎症因子水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	10	52.82 ± 6.22	62.19 ± 5.20	355.59 ± 31.63
LPS 组	10	91.25 ± 10.55 ^a	93.10 ± 6.16 ^a	558.59 ± 48.54 ^a
LPS+AICAR 组	10	68.93 ± 9.37 ^b	80.03 ± 7.86 ^b	484.77 ± 51.00 ^b

注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂, IL 为白细胞介素, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.4 各组小鼠血清肾功能指标比较 (表 3): 与对照组比较, LPS 组小鼠血清 SCr 和 BUN 水平均升高 (均 $P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠血清 SCr 和 BUN 水平均降低 (均 $P < 0.05$)。提示激活 AMPK 可降低小鼠肾功能指标水平。

表 3 各组小鼠血清肾功能指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
对照组	10	19.55 ± 3.64	10.76 ± 2.85
LPS 组	10	57.63 ± 6.37 ^a	36.35 ± 5.47 ^a
LPS+AICAR 组	10	31.75 ± 5.08 ^b	23.93 ± 4.44 ^b

注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂, SCr 为血肌酐, BUN 为血尿素氮; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.5 各组小鼠肾组织铁死亡关键因子表达比较 (表 4): 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织 Fe²⁺ 累积, MDA 水平升高, GSH 水平降低 (均 $P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠肾组织 Fe²⁺ 和 MDA 水平降低, GSH 水平升高 (均 $P < 0.05$)。提示激活 AMPK 可抑制铁死亡关键因子的表达。

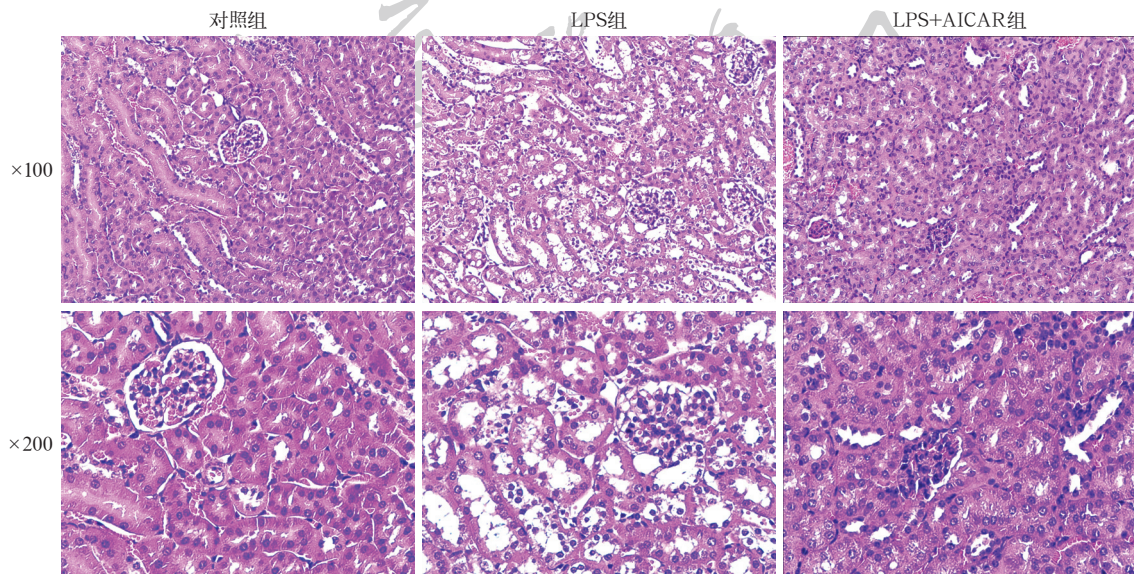


图 2 光镜下观察各组小鼠肾组织病理学改变 对照组肾组织结构正常; 脂多糖 (LPS) 组肾组织上皮细胞出现空泡变性和坏死, 间隙肿胀, 部分上皮细胞脱落, 炎症细胞浸润; LPS+ 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激活剂 (AICAR) 组肾组织病理学改变较 LPS 组减轻 苏木素-伊红 (HE) 染色

表 4 各组小鼠肾组织 Fe²⁺、MDA 和 GSH 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Fe ²⁺ (μmol/g)	MDA (μmol/g)	GSH (μmol/kg)
对照组	10	2.40 ± 0.84	1.00 ± 0.32	6.19 ± 0.81
LPS 组	10	6.84 ± 1.41 ^a	2.62 ± 0.62 ^a	3.49 ± 0.94 ^a
LPS+AICAR 组	10	4.02 ± 0.74 ^b	1.44 ± 0.62 ^b	4.35 ± 0.50 ^b

注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂, MDA 为丙二醛, GSH 为谷胱甘肽; 与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 LPS 组比较, ^b*P*<0.05

2.6 各组小鼠肾组织线粒体形态改变(图 3): 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织线粒体表现出典型铁死亡特征, 即线粒体体积缩小、膜密度增加和线粒体嵴减少; 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠肾组织线粒体体积和嵴消失等铁死亡特征改变明显减轻。提示激活 AMPK 可减轻小鼠肾组织线粒体损伤。

2.7 各组小鼠肾组织铁死亡关键酶的表达比较(表 5; 图 4): 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织 ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达均升高, SLC7A11、GPX4 的 mRNA 和蛋白表达均降低(均 *P*<0.05); 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠肾组织 ACSL4 的 mRNA 和

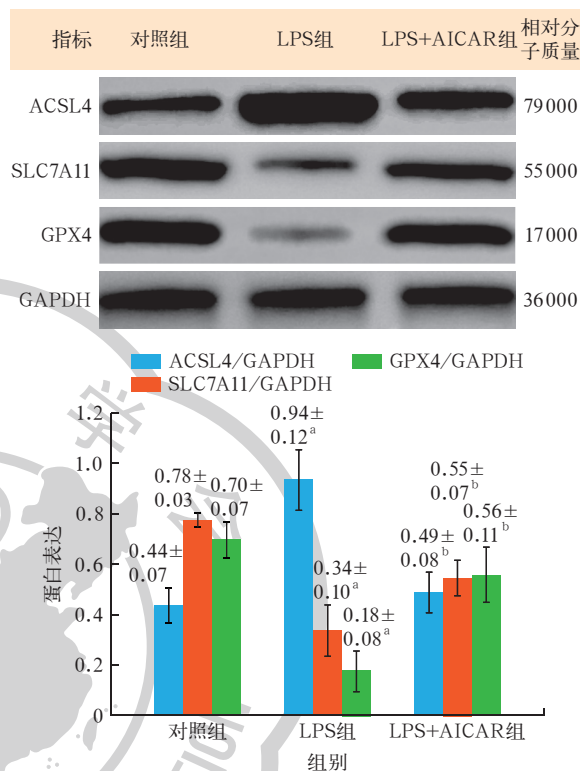
表 5 各组小鼠肾组织铁死亡关键酶及 Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达比较(2^{-ΔΔCt}, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	ACSL4 mRNA	SLC7A11 mRNA
对照组	10	1.09 ± 0.29	0.16 ± 0.03
LPS 组	10	3.67 ± 0.80 ^a	0.01 ± 0.00 ^a
LPS+AICAR 组	10	1.98 ± 0.50 ^b	0.04 ± 0.01 ^b

组别	动物数 (只)	GPX4 mRNA	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA
对照组	10	11.61 ± 0.87	1.37 ± 0.45	0.30 ± 0.48
LPS 组	10	3.40 ± 0.45 ^a	0.22 ± 0.23 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
LPS+AICAR 组	10	5.15 ± 1.21 ^b	0.57 ± 0.29 ^b	0.12 ± 0.03 ^b

注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂, ACSL4 为长链酰基辅酶 A 合成酶 4, SLC7A11 为溶质载体家族 7 成员 11, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, HO-1 为血红素加氧酶 1; 与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 LPS 组比较, ^b*P*<0.05

蛋白表达均降低, SLC7A11、GPX4 的 mRNA 和蛋白表达均升高(均 *P*<0.05)。提示激活 AMPK 可抑制铁死亡关键酶的表达。



注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂, ACSL4 为长链酰基辅酶 A 合成酶 4, SLC7A11 为溶质载体家族 7 成员 11, GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 LPS 组比较, ^b*P*<0.05

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠肾组织铁死亡关键酶的蛋白表达

2.8 各组小鼠肾组织 Nrf2/HO-1 通路的表达比较(表 5; 图 5): 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达均降低(均 *P*<0.05); 与 LPS 组比较, LPS+AICAR 组小鼠肾组织 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达均升高(均 *P*<0.05)。提示激活 AMPK 可能通过 Nrf2/HO-1 通路抑制铁死亡发挥作用。

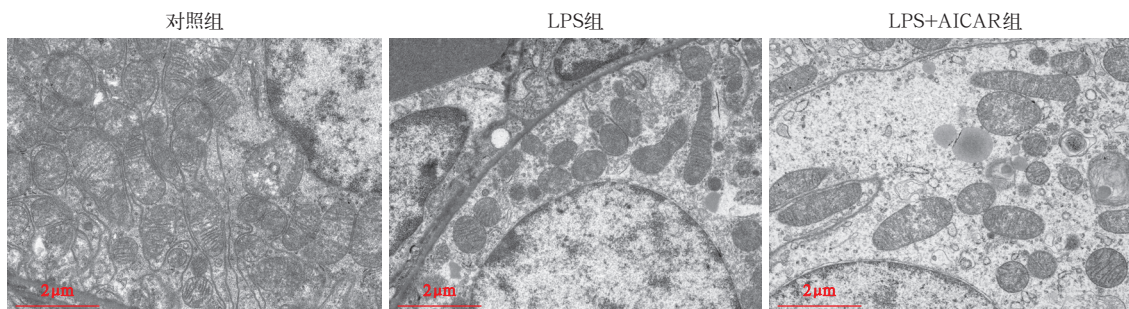
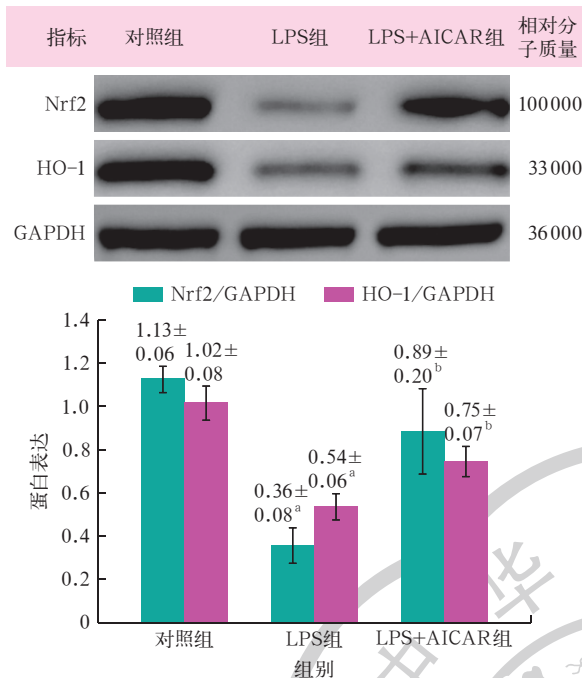


图 3 透射电镜下观察各组小鼠肾组织线粒体形态改变 对照组肾组织线粒体膜结构完整, 线粒体嵴清晰; 脂多糖(LPS)组小鼠肾组织线粒体表现出典型的铁死亡特征, 即线粒体体积缩小、膜密度增加和线粒体嵴减少; LPS+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂(AICAR)组小鼠肾组织线粒体体积和嵴消失等铁死亡特征改变明显减轻 轴-铅双重电子染色 ×7000



注: LPS 为脂多糖, AICAR 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激动剂, Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, HO-1 为血红素加氧酶 1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与 LPS 组比较, ^b*P* < 0.05

图 5 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肾组织 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达

3 讨论

AKI 的主要特征包括炎症反应、氧化应激失调和线粒体代谢障碍。炎症在脓毒症的发病机制中发挥着重要作用, 过度的炎症状态会增加脓毒症患者的能量需求, 促使免疫细胞经历代谢重编程, 由氧化磷酸化向糖酵解转变^[8-9]。虽然这种转变在脓毒症的早期阶段可能有益, 但随之而来的代谢重编程却可能导致器官的持续损伤, 增加肾功能恶化、慢性肾病和寿命缩短的风险^[10-11]。AMPK 是一种高度保守的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 主要的催化亚基为 AMPK α 1, 其活性受细胞内 AMP 和 ATP 比例的影响。当 AMP 增加时, AMPK α 亚基的 Thr-172 被磷酸化, 激活 AMPK, 使其成为细胞的能量传感器^[11]。激活 AMPK 可通过促进线粒体生物合成、葡萄糖转运和脂肪酸氧化来增加 ATP 的生成, 同时抑制脂肪酸、蛋白质和糖原的合成, 导致代谢重编程, 从而维持细胞能量平衡。既往研究表明, AMPK 的激活可减轻小鼠的脑组织缺血再灌注损伤, 且 AMPK 的持续激活有助于保护肾小管细胞免受高尿酸引起的损伤^[4]。因此, 本研究拟验证 AMPK 是否可减轻 LPS 诱导的 SA-AKI。

LPS 是革兰阴性菌外膜的重要组成部分, 通过

刺激促炎细胞因子的产生引发急性炎症, 导致广泛的组织和细胞损伤, 成为 SA-AKI 的关键致病因素之一^[12-13]。LPS 注射法构建动物模型更容易操作、侵入性低、诱导脓毒症速度更快, 且均一性更高, 适用于研究早期的炎症及免疫反应对器官损伤的影响^[14]。因此, 本研究以此模型为基础, 通过特异性激活 AMPK, 干预 LPS 诱导的小鼠 SA-AKI 模型, 探讨 AMPK 的保护作用及其机制。结果显示, LPS 组小鼠的血清肾功能指标和炎症因子水平显著升高, 肾组织病理损伤明显, 细胞出现空泡变性和坏死, 表明模型构建成功; 而激活 AMPK 后, 小鼠的肾功能指标和炎症因子水平降低, 肾组织损伤明显改善, 提示 AMPK 激活能缓解 LPS 诱导的 SA-AKI。

铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式, 与 AKI 密切相关, 其特征是铁依赖性脂质过氧化^[15-16]。细胞内 Fe^{2+} 的积累通过芬顿反应产生活性氧, 导致脂质过氧化, 形成 MDA 产物, 进而引发铁死亡。GPX4 和 SLC7A11 是抗脂质过氧化的重要因子, GSH 也可在 GPX 的作用下降低脂质过氧化物累积, 而 ACSL4 则调控脂质合成。有研究表明, AMPK 的激活通过抑制乙酰辅酶 A 羧化酶调节能量代谢, 与铁死亡密切相关^[17]。同时有实验证明, AMPK 的激活可能通过抑制铁死亡来减轻小鼠脑组织的缺血再灌注损伤, 亦可防止心肌损伤^[18-19]。本实验结果显示, 与对照组比较, LPS 组小鼠肾组织中 Fe^{2+} 累积和参与脂质合成因子 (MDA、ACSL4) 水平明显升高, 抗脂质氧化因子 (SLC7A11、GPX4、GSH) 水平明显下降; 而 AMPK 激活后, Fe^{2+} 、MDA 和 ACSL4 水平明显下降, GSH、SLC7A11 和 GPX4 水平明显上升; 其可能是由于 AMPK 上调了抗脂质氧化机制抑制铁死亡的发生。值得注意的是, 本实验透射电镜下显示, LPS 组肾皮质线粒体表现出典型的铁死亡特征, 即线粒体体积缩小、膜密度增加和线粒体嵴减少; 激活 AMPK 后线粒体形态改善、嵴消失等铁死亡特征改变明显减轻; 说明 AMPK 可能通过改善线粒体代谢减轻铁死亡。

此外, Nrf2 是一种应激反应性转录因子, 能够调节抗氧化酶如 HO-1 的表达, 发挥抗氧化和抗炎作用^[20]。Bai 等^[21]研究发现, 传统草药苦参中的高丽槐素通过激活 AMPK/Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化和抗炎特性, 从而减轻脓毒症小鼠器官损伤及降低死亡率。Sun 等^[22]研究显示, 丁苯酞通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制大鼠铁死亡, 改善脑缺血再灌注

损伤。本研究进一步分析 AMPK 是否可能通过该途径影响铁死亡从而发挥作用,结果表明, LPS 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 及蛋白表达明显降低,而激活 AMPK 后其 mRNA 及蛋白表达明显升高,表明 AMPK 激活可能通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制铁死亡,从而发挥对 SA-AKI 的保护作用。

综上所述,AMPK 激活可能通过 Nrf2/HO-1 通路抑制小鼠肾脏中铁死亡,减轻 LPS 诱导的 SA-AKI,为 AMPK 在脓毒症治疗中的应用提供了新的见解和理论支持。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王勉:实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、支持性贡献;康印东:酝酿和设计实验、实施研究、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、获取研究经费、指导;张斌:分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、行政、技术或材料支持、指导、支持性贡献;张春雷:酝酿和设计实验、分析/解释数据、起草文章、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、指导、支持性贡献;李佛荣:实施研究、采集数据、起草文章、统计分析;蒋星明、李家豪:采集数据、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析;常德辉:酝酿和设计实验,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(5): 1083–1099. DOI: 10.1016/j.kint.2019.05.026.
- [3] Kounatidis D, Vallianou NG, Psallida S, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: where are we now?[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2024, 60(3): 434. DOI: 10.3390/medicina60030434.
- [4] 胡森,童旭辉,黄杰,等.基于铁死亡探讨 AMPK 抗小鼠脑缺血/再灌注损伤的作用及机制[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2021, 50(4): 418–423. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2021.04.002.
- [5] 王锦妮,汪靓婧,王美茜,等.汉黄芩素对脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(8): 1411–1416. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.018.
- [6] Yu YY, Li XQ, Hu WP, et al. Self-developed NF- κ B inhibitor 270 protects against LPS-induced acute kidney injury and lung injury through improving inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112615. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112615.
- [7] Huang X, Hou XP, Chuan LB, et al. miR-129-5p alleviates LPS-induced acute kidney injury via targeting HMGB1/TLRs/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A): 107016. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107016.
- [8] Tran M, Tam D, Bardia A, et al. PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 4003–4014. DOI: 10.1172/JCI58662.
- [9] 郑星月,周芳芳,罗群.近端肾小管上皮细胞代谢重编程在急性肾损伤中的研究进展[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2024, 33(1): 59–63. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2024.01.012.
- [10] Manrique-Caballero CL, Kellum JA, Gómez H, et al. Innovations and emerging therapies to combat renal cell damage: NAD⁺ as a drug target[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(17): 1449–1466. DOI: 10.1089/ars.2020.8066.
- [11] Zhao Y, Hu XB, Liu YJ, et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 79. DOI: 10.1186/s12943-017-0648-1.
- [12] Qiu Z, He YH, Ming H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 8151836. DOI: 10.1155/2019/8151836.
- [13] Lu XY, Wang J, Chen XH, et al. Rolipram protects mice from gram-negative bacterium *Escherichia coli*-induced inflammation and septic shock[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 175. DOI: 10.1038/s41598-019-56899-6.
- [14] Chang YC, Han ZW, Zhang Y, et al. G protein-coupled estrogen receptor activation improves contractile and diastolic functions in rat renal interlobular artery to protect against renal ischemia reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108666. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108666.
- [15] Li J, Cao F, Yin HL, Huang ZJ, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- [16] 赖玮婧,黄蓉双,王波,等.肾脏病中铁死亡的病理生理机制和药物治疗研究进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2024, 40(5): 411–417. DOI: 10.3760/cma.j.cn441217-20230810-00814.
- [17] Lee H, Zandkarimi F, Zhang YL, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225–234. DOI: 10.1038/s41556-020-0461-8.
- [18] Zhou B, Zhang J, Chen YX, et al. Puerarin protects against sepsis-induced myocardial injury through AMPK-mediated ferroptosis signaling[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(8): 3617–3632. DOI: 10.18632/aging.204033.
- [19] Ryabov VV, Maslov LN, Vyshlov EV, et al. Ferroptosis, a regulated form of cell death, as a target for the development of novel drugs preventing ischemia/reperfusion of cardiac injury, cardiomyopathy and stress-induced cardiac injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 897. DOI: 10.3390/ijms25020897.
- [20] Zhang DD, Chapman E. The role of natural products in revealing NRF2 function[J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37(6): 797–826. DOI: 10.1039/c9np00061e.
- [21] Bai XX, Zhu YJ, Jie J, et al. Maackiain protects against sepsis via activating AMPK/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108710. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108710. Erratum in: *Int Immunopharmacol*, 2024, 140: 112877. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112877.
- [22] Sun ML, Chen JM, Liu F, et al. Butylphthalide inhibits ferroptosis and ameliorates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf2/HO-1 signalling pathway[J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(5): e00444. DOI: 10.1016/j.neurot.2024.e00444.

(收稿日期: 2025-03-03)

(本文编辑: 张耘菲)

关于杜绝和抵制第三方机构代写代投稿件的通知

近期中华医学会杂志社学术期刊出版平台在后台监测到部分用户使用虚假的手机号和 Email 地址注册账号,这些账号的投稿 IP 地址与作者所在单位所属行政区域严重偏离,涉嫌第三方机构代写代投。此类行为属于严重的学术不端,我们已将排查到的稿件信息通报各编辑部,杂志社新媒体部也将对此类账号做封禁处理,相关稿件一律做退稿处理。

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,请广大读者和作者务必提高认识,规范行为,以免给作者的学术诚信、职业发展和所在单位的声誉带来不良影响。

(中华医学会杂志社)